

【総説】

第8回 高安賞優秀賞受賞論文

論文 「Identification of lipoteichoic acid as a ligand for Draper in the phagocytosis of *Staphylococcus aureus* by *Drosophila* hemocytes」
 The Journal of Immunology
 Vol. 183, Page 7451-7460 2009年12月掲載
 橋本優実, 田淵幸幾, 櫻井健次, 久網真由美, 黒川健児,
 栗崎 健, 関水と久, 中西義信, 白土明子 共著

ショウジョウバエヘモサイトによる黄色ブドウ球菌貪食における Draperのリガンドとしてのリポタイコ酸の同定

橋本 優実 (はしもと ゆみ)

背 景

生体内に細菌が侵入すると、宿主の免疫系はそれを感じて排除する。その排除のしくみの一つに、宿主の食細胞による細菌の貪食がある。哺乳類などの獲得免疫を持つ生物では、主に、食細胞が抗体を介して細菌の表層分子を間接的に認識し貪食が誘導される。一方、昆虫などの獲得免疫を持たない生物には抗体がない。そのため、食細胞は自身の表層にある受容体を介して細菌の表層分子を直接認識すると考えられている。抗体を介さない貪食は、多くの生物が共通に持つ自然免疫に分類される (Medzhitovら¹⁾)。これまでに、ショウジョウバエを用いた研究により、自然免疫における細菌貪食の受容体が複数見出された。しかし、これらが認識する細菌表層の貪食リガンドは同定されていない。そこで私たちは、細菌とショウジョウバエの両方に遺伝学を適用して、細菌表層の貪食リガンドとそれを認識する貪食受容体の同定を行った。

結 果

貪食リガンドは細菌の細胞壁成分であると予想し、細胞壁各成分の合成が正常でない変異菌株ライブラリの菌群について被貪食能を調べた。そのために、ショウジョウバエ幼虫から単離したヘモサイトを食細胞とし、蛍光標識した黄色ブドウ球菌を貪食の標的とする *in vitro* 貪食解析を行った。その結果、*ltaS* という遺伝子を欠損した菌の貪食程度が、親菌株と比べて小さいことがわかった。そして、この被貪食能の低下は、変異菌株への *ltaS* 遺伝子の導入により回復した (図1左)。さらに、ショウジョウバエ成虫に黄色ブドウ球菌を注入してヘモサイトによる貪食を調べる *in vivo* 解析においても、*ltaS* 遺伝子

欠損菌株は親菌株よりも貪食されにくいことが示された。*ltaS* 遺伝子は、黄色ブドウ球菌などのグラム陽性菌の細胞壁成分であるリポタイコ酸の合成酵素をコードしている (Okuら²⁾)。これらの結果より、リポタイコ酸が黄色ブドウ球菌の貪食に必要なと考えられた。

次に、*ltaS* 遺伝子を必要とする黄色ブドウ球菌の貪食におけるヘモサイト側の受容体を明らかにするための実験を行った。まず、既知の貪食受容体 Eater (Kocksら³⁾)、Nimrod C1 (Kuruczら⁴⁾)、あるいは Draper (Cuttellら⁵⁾) を欠損または発現低下したショウジョウバエヘモサイトによる *ltaS* 遺伝子欠損菌株の貪食程度を調べた。その結果、Draper を欠損するヘモサイトを用いたときのみ *ltaS* 遺伝子の必要性が認められなかった (図1右)。この結果より、リポタイコ酸を介した貪食にヘモサイトの Draper が必要であるとわかった。

そこで次に、リポタイコ酸が Draper のリガンドであ

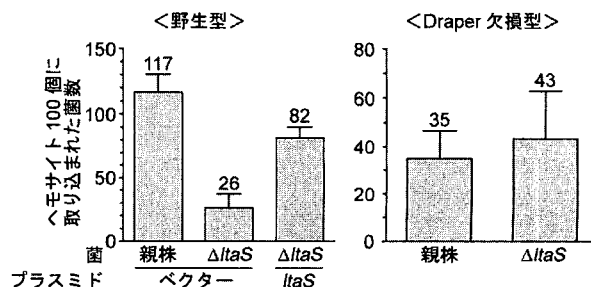


図1. 野生型および Draper 欠損型ショウジョウバエヘモサイトによる *ltaS* 欠損黄色ブドウ球菌の貪食
 野生型ヘモサイトを使った貪食反応では、*ltaS* 遺伝子欠損菌株 ($\Delta ltaS$) の方が親菌株よりも貪食されにくく、 $\Delta ltaS$ への *ltaS* 遺伝子導入により被貪食能が増加した (左)。Draper 欠損型ヘモサイトを使った貪食反応では、*ltaS* 遺伝子の有無によらず貪食程度にほとんど差がなかった (右)。

るかどうかを調べた。両者の結合を調べるために、Draper細胞外領域をGST融合タンパク質として調製し、それを吸着させた膜に黄色ブドウ球菌由来のリポタイコ酸を反応させ、抗リポタイコ酸抗体により検出した。その結果、GST融合Draperタンパク質を吸着させた膜では、陰性コントロールのGSTと比べて抗体由来のシグナルが強かった (図2)。また、Draperタンパク質が*ltaS*遺伝子依存に黄色ブドウ球菌へ結合すること、およびリポタイコ酸がDraperを介してヘモサイトに結合することを示す結果も得られた。これらの結果より、両者が結合するとわかり、黄色ブドウ球菌のリポタイコ酸がDraperのリガンドであると結論された。

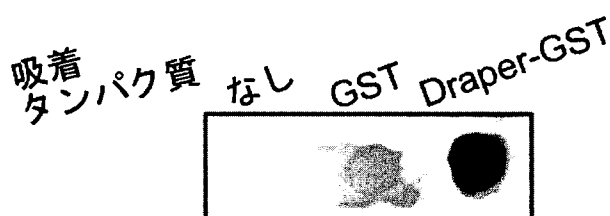


図2. 黄色ブドウ球菌由来リポタイコ酸とDraperタンパク質との結合解析
GSTあるいはGST融合Draper細胞外領域タンパク質 (Draper-GST) を吸着させた膜にリポタイコ酸を反応させ、抗リポタイコ酸抗体で検出した。GSTと比べて、Draper-GSTを吸着させた部分では、抗リポタイコ酸抗体のシグナルが強かった。

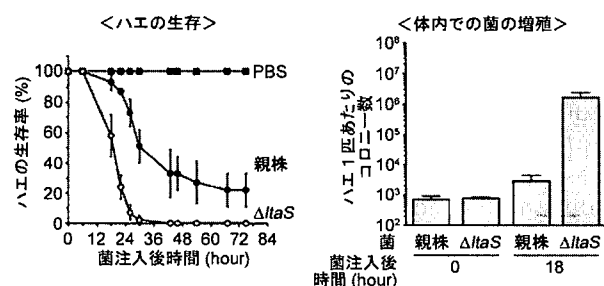


図3. *ltaS*遺伝子欠損黄色ブドウ球菌のショウジョウバエへの病原性と体内での増殖
*ltaS*遺伝子欠損菌株 ($\Delta ltaS$) 注入後のハエ成虫の生存率およびハエ体内の菌のコロニー数を解析した。親株の注入と比べて $\Delta ltaS$ を注入したときには、ハエの生存率は大きく低下し (左)、18時間後での菌の増殖程度が大きかった (右)。

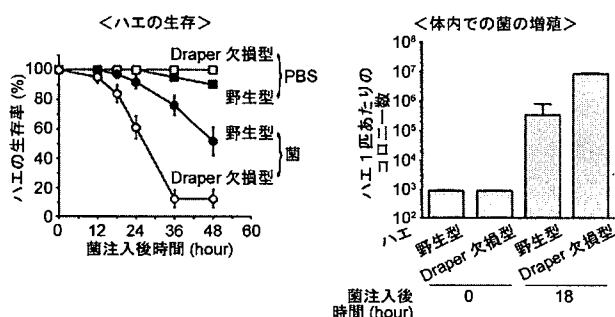


図4. Draper欠損型ショウジョウバエへの黄色ブドウ球菌の病原性と体内での増殖
黄色ブドウ球菌 (親株菌) 注入後のDraper欠損型ハエ成虫について図3と同様に解析した。野生型ハエと比較してDraper欠損型ハエは、菌注入後に早く死に (左)、18時間後での体内での菌の増殖程度が大きかった (右)。

最後に、この貪食反応が宿主の感染防御に働くかを調べた。そのために、黄色ブドウ球菌を顕微注入により感染させたショウジョウバエ成虫の生存程度および成虫体内での菌の増殖程度を調べた。その結果、*ltaS*遺伝子の欠損あるいはDraperの欠損により、成虫の生存率の低下および成虫体内における菌増殖の増大が観察された (図3, 4)。これらの結果より、リポタイコ酸とDraperを介した貪食は、黄色ブドウ球菌に感染したショウジョウバエの防御反応であると考えられた。

まとめ

病原体と宿主の両者に遺伝学を適用した研究により、自然免疫における細菌貪食のしくみが明らかにされた。特に、ショウジョウバエ食細胞による黄色ブドウ球菌の貪食における細菌側のリガンドを初めて明らかにし、さらにその受容体を同定した。そして、この貪食は、宿主の感染防御に働くことが考えられた。しかし、今回明らかにしたリガンドおよびその受容体を欠損させても、食細胞の細菌貪食活性は完全には阻害されなかった。このことは別のリガンドと受容体の組み合わせによっても貪食が行われること示している。今後、その反応の実体を明らかにすることがショウジョウバエにおける貪食による細菌感染防御機構の解明に必要である。

文献

- 1) Medzhitov R. Recognition of microorganisms and activation of the immune response. *Nature* 449: 819-826, 2007
- 2) Oku Y, Kurokawa K, Matsuo M, Yamada S, Lee BL, Sekimizu K. Pleiotropic roles of polyglycerolphosphate synthase of lipoteichoic acid in growth of *Staphylococcus aureus* cells. *J Bacteriol* 191: 141-151, 2009
- 3) Kocks C, Cho JH, Nehme N, Ulvila J, Pearson AM, Meister M, Strom C, Conto SL, Hetru C, Stuart LM, Stehle T, Hoffmann JA, Reichhart JM, Ferrandon D, R  met M, Ezekowitz RA. Eater, a transmembrane protein mediating phagocytosis of bacterial pathogens in *Drosophila*. *Cell* 123: 335-346, 2005
- 4) Kurucz E, M  rkus R, Zs  mboki J, Folkl-Medzihradsky K, Darula Z, Vilmos P, Udvardy A, Krausz I, Lukacsovich T, Gateff E, Zettervall CJ, Hultmark D, And   I. Nimrod, a putative phagocytosis receptor with EGF repeats in *Drosophila* plasmatocytes. *Curr Biol* 17: 649-654, 2005
- 5) Cuttell L, Vaughan A, Silva E, Escaron CJ, Lavine M, Van Goethem E, Eid JP, Quirin M, Franc NC. Undertaker, a *Drosophila* junctophilin, links Draper-mediated phagocytosis and calcium homeostasis. *Cell* 135: 524-534, 2008



Profile

所 属 金沢医科大学医学部生化学Ⅰ研究室 (助教)
2006年3月 金沢大学大学院自然科学研究科博士前期課程 修了
2010年3月 金沢大学大学院医学系研究科博士課程 修了